

1  
SPECIFICATION

Novel Human Parvovirus B19 Receptor and Uses Thereof

発明の属する技術分野

本発明は、新規なヒトパルボウイルスB19レセプター及びその用途、並びに同レセプターを提示する細胞の製造方法に関する。

従来の技術

ヒトパルボウイルスB19（以下、単に「B19」と略することがある）は小児の伝染性紅斑（文献1）、妊婦の感染による胎児水腫（文献2）、急性赤芽球癆（文献3）、成人の多発性関節炎（文献4、5）など様々な病態の原因となる一本鎖DNAウイルスである。B19の感染レセプターとして、赤血球膜上に発現する血液型糖脂質のP抗原（Globoside）が1993年Youngらにより同定された（文献6）。この事は、臨床的にB19感染抵抗性を示す例では、P抗原発現を欠くPhenotypeを呈することでも支持され（文献7）、P抗原がB19の感染レセプターであり、P抗原を高発現する赤芽球系細胞が感染標的細胞であると理解されるに至った。B19感染症では、赤芽球系細胞への感染による貧血が主な症状となる。しかし、白血球減少症や血小板減少症（文献8）、自己抗体の出現などの免疫異常を示す現象が観察されること、B19感染後に関節リウマチに進展する症例が報告されていること、末梢血中顆粒球や関節でB19DNAが証明されるなど（文献9、10、11）、B19の赤芽球系細胞への感染のみでは理解することが困難な病態を呈する場合があり、B19感染症ではP抗原を介した赤芽球細胞への感染以外の未知のB19感染様式の存在も指摘されている。また、一方では、B19感染感受性細胞株での研究より、P抗原発現量とB19感染効率に相関を認めがたいことから、P抗原以外のB19感染関連分子（co-receptorなど）の存在が指摘されている（文献12）。このようにP抗原とは異なるB19感染関連分子の存在が予測されているが、現時点では不明である。ウイルスの感染レセプターとして、しばしば複数の分子が関連し、それらがco-receptorとしてウイルス感染に関与する機能が報告されている。例えば、human immunodeficiency virus (HIV) ではケモカインレセプターが（文献13）、エコーウイルスではvery late antigen 2 (VLA2) が（文献14）、adeno associated virus 2 (AAV2) では $\alpha V\beta 5$  インテグリン（文献15）がそれぞれco-receptorとして機能し、これらの分子がウイルス感染感受性や感染特異性を決定する重要な役割を担っていることが証明されている。B19においても他のウイルス同様にP抗原以外の感染レセプターまたはco-receptorを持つ可能性が推定される。B19感染に関与する分子を明らかにすることは、B19の感染メカニズムの解明に資するのみならず、B19感染に伴う様々な病態の理解に貢献し、B19感染症の診断・治療にも有用な情報となりうる。

本願発明者らはこれまでにB19感染後関節リウマチへ進展していった患者の関節滑膜において、滑膜組織中に浸潤したT・Bリンパ球、樹状細胞、マクロファージ等の免疫細胞でB19構造蛋白B19-VP1蛋白が検出されることを見出し、免疫細胞がB19の感染標的細胞となることを報告してきた（文献10）。これらの免疫細胞にはB19のレセプターであるP抗原の発現は乏しいとされており、P抗原蛋白以外の分子を介した免疫細胞へのB19感染の可能性が示唆された。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、P抗原以外の新規なヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提供すること、及び、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを利用した、ヒトパルボウイルスB19を測定用試薬、吸着用試薬及び感染抑制剤を提供することである。また、本発明の目的は、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターとヒトパルボウイルスB19との結合を阻害することによりヒトパルボウイルスB19の感染を抑制する手段を提供することである。さらに、本発明の目的は、該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提示する細胞の製造方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

本願発明者らは、鋭意研究の結果、全身性エリテマトーデス(SLE)例で認められる自己抗体の標的自己抗原として見いだされた80kDaのタンパク質であるKu80がヒトパルボウイルスB19の感染レセプターであることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該配列において少数のアミノ酸残基が置換し若しくは欠失し、若しくは該配列に少数のアミノ酸残基が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有しヒトパルボウイルスB19と結合するタンパク質から成る、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提供する。また、本発明は、上記本発明のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターから成るヒトパルボウイルスB19結合剤を提供する。さらに、本発明は、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターとヒトパルボウイルスB19の結合を阻害する物質又はその結合性断片を有効成分として含有するヒトパルボウイルスB19の感染抑制剤を提供する。また、本発明は、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを提示する細胞の製造方法を提供する。

本発明により、新規なB19レセプターが提供された。本発明のB19レセプターは、B19と特異的に結合するので、B19測定用試薬やB19吸着剤としての用途を有する。さらに、B19レセプターと抗原抗体反応する抗体は、B19の複製を抑制するので、B19の感染抑制剤として用いることができる。

### 図面の簡単な説明

図1は、各種細胞株におけるB19感染状態を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図2は、各種細胞株におけるP抗原の発現状態を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図3は、H9細胞へのリコンビナントB19カプシド(rB19ECP)の結合を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図4は、rB19ECP-Sepharose結合蛋白のマスマスペクトルを示す図である。

図5は、rB19ECP結合蛋白のWestern blot解析の結果を示す図である。

図6は、rB19ECPとビオチン化rKu80の結合実験の結果を示す図である。

図7は、rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(1)の結果を示す図である。

図8は、rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(2)の結果を示す図である。

図9は、rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(3)の結果を示す図である。

図10は、rB19ECPとビオチン化rKu80の結合抑制実験(4)の結果を示す図である。

図11は、各種細胞株における細胞表面Ku80の発現状態を表すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図12は、KU812Ep6細胞株へのB19吸着抑制実験の結果を示す図である。

図13は、KU812Ep6細胞株へのB19複製抑制実験の結果を示す図である。

図14は、骨髓細胞表面のKu80の発現状態を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

上記の通り、本願発明者らはKu80が、P抗原以外の新たなヒトパルボウイルスB19に対するレセプターであることを見出した(以下ヒトパルボウイルスB19をB19と略す)。Ku80は、Ku80はSLE例で認められる自己抗体の標的自己抗原として見いだされた80kDaの蛋白である。Ku80は細胞内蛋白として局在し、機能することが知られている。Ku80は、Ku70とヘテロダイマーを形成し(文献19)、細胞内でDNA依存性プロテインキナーゼの調節因子としてDNA修復や組換えに関与するとされている(文献23、24)。一方Ku80は、低酸素環境下で血管内皮細胞やヒト筋肉腫細胞株RD細胞表面に発現が認められるようになり、リンパ球系細胞の接着に関係しているとの報告もある(文献25、26、27)。またヒト胃癌細胞株HGT-1細胞表面に発現しているKu80はソマトスタチンレセプターとして機能し、シグナル伝達に関与することが報告されている(文献28)。以上の報告にみられるように、Ku80は細胞表面で発現し、機能を有する場合が知られている。

Ku80遺伝子の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示し、

そのアミノ酸配列のみを取り出して配列番号1に示す(GenBank Accession No. M30938)。

なお、一般に、生理活性を有するペプチドでは、該ペプチドのアミノ酸配列において少数のアミノ酸が置換し、欠失し、挿入され又は付加された場合であっても、その生理活性が維持される場合があることは当業者によって認められているところである。従って、配列番号1に示すKu80のアミノ酸配列において、少数のアミノ酸が置換し、欠失し、挿入され又は付加されたペプチドあって、B19との結合能を維持するものは、Ku80と同様に利用することができ、本発明の範囲に含まれる。ここで、「少数」とは、1個ないし数個であることが好ましく、又は配列番号1のアミノ酸配列と90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するものが好ましい。なお、アミノ酸配列の相同性は、FASTAのような周知のコンピューターソフトを用いて容易に算出することができ、このようなソフトはインターネットによっても利用に供されている。そして、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸(Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸(Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸(Phe, Tyr, Trp)のように類似の性質を有するものにグループ分けでき、アミノ酸が置換する場合、これらの各グループ内での置換であればポリペプチドの性質が変化しないことが多く、好ましい。

下記実施例で実験的に確認されたとおり、Ku80はB19と特異的に、すなわち、Ku80がB19の感染レセプターとして機能し、B19がKu80のリガンドとして機能して両者は結合する。従って、Ku80はB19に対する特異的な結合剤として用いることができる。ここで、「結合剤」とは、B19に特異的に結合させ、この特異的な結合を何らかの用途に利用するためのものであり、より具体的な用途の好ましい例としては、B19測定用試薬、B19吸着剤及びB19感染抑制剤を挙げることができる。以下、これらについてさらに説明する。

本発明のB19の感染レセプターは、B19と特異的に結合するので、本発明のレセプターを用いてB19を測定することができる。なお、「測定」には検出と定量の両者が包含される。これは、抗原と抗体との特異的結合(抗原抗体反応)を利用した免疫測定方法と同様に行うことができる。例えば、本発明のレセプターを固相化し、B19を含む検体を固相化レセプターと接触させ、洗浄後、蛍光標識や酵素標識などの標識を付した抗B19抗体と反応させ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中のB19を測定することができる。本発明のレセプターは、タンパク質であるので、レセプターの固相化は、周知の方法、例えば、ポリスチレン製のマイクロプレートのウェルやニトロセルロースフィルター等への物理吸着や、官能基を有する担体へのアミノ基を介した共有結合等により容易に行うことができる。B19感染レセプターを直製応用したB19の検出法としてはP抗原をリガンドとしてReceptor-mediated hemagglutination assay(文献33)が開発され、輸血血液中のB19のスクリーニングに用いられているが、Ku80をP抗原に代えることにより新規なReceptor-mediated hemagglutination assayを確立することが可能である。特にP抗原は糖鎖抗原であり化学合成が困難である一方、Ku80はペプチドであり、コード遺伝子配列も明らかにされており、リコンビナント蛋白質として大量生産が可能であり、断片としての産生も容易である。

また、本発明のB19の感染レセプターは、B19と特異的に結合するので、本発明のレセプターはB19の吸着剤としても用いることができる。B19は、小型のウイルスであり、フィルターで除去するのが困難である。本発明のレセプターを固相化したフィルターや、本発明のレセプターを固相化した担体を充填したカラムに、B19を含む試料を通すことにより、B19を除去することができる。また、固相化レセプターに吸着されたB19は、尿素処理、グアニジン処理、pH変化、塩濃度変化等の処理によって遊離されるので、上記固相化レセプターは、B19の精製又は濃縮に利用することができる。

本発明のB19に対するレセプターは、B19と特異的に結合するので、本発明のレセプターとB19の結合を阻害することで、B19の感染を抑制することができ、B19感染抑制剤として利用することができる。さらに、本発明のレセプターとB19を用いて結合を阻害する物質を選択することにより、B19感染抑制剤として利用する物質を見出すことができる。本発明のレセプターとB19の結合を阻害する物質としては、本発明のレ

セプターに由来するポリペプチド及びそのウイルス結合性断片、本発明のレセプターに抗原抗体反応する抗体及びその抗原結合性断片、B19に由来するポリペプチド及びそのレセプター結合性断片並びにB19に抗原抗体反応する抗体及びその抗原結合性断片等を挙げるができるが、これらに限定されるものではない。本発明のレセプターとB19の結合を阻害する物質は、例えば以下の手順に従って選択することができる。精製されたKu80、遺伝子工学的手法により得られたKu80又はKu80発現細胞を固相化する。そこに、B19又はrB19ECPとともに選択される物質を添加し反応させる。洗浄後、固相のKu80に結合したB19又はrB19ECPを抗B19抗体で定量的に測定することにより、Ku80とB19の結合を阻害する物質を見出すことができる。結合を阻害する物質としては、各種のランダムライブラリーから選択することもできるが、以下のような手順で、結合を阻害する可能性の高い物質を絞り込むことができる。例えば、Ku80を固相化したカラムを作成し、B19をプロテアーゼ等により断片化したペプチドを通過させ、洗浄後溶出する。ここで、得られたKu80に対して結合性を有するB19由来のペプチドは、Ku80とB19の結合を阻害する可能性が高い物質である。また、さらにこのB19由来のペプチドを常法に従って免疫することによって、Ku80とB19の結合を阻害する可能性が高い抗B19抗体を得ることができる。

尚、本発明における感染抑制剤は、有効成分としての本発明のレセプターまたはその一部に結合する抗体、好ましくはヒト化抗体、またはモノクローナル抗体、好ましくはヒトモノクローナル抗体若しくはその一部と薬学的に許容され得る担体とからなる医薬品として有用な医薬組成物を意味する。このような薬学的に許容され得る担体としては、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味料、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤などが含まれる。投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは医薬組成物としての感染抑制剤に含有される活性成分（抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から $1000\text{mg}$ の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る液性担体中に $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において $1\text{kg}$ 体重あたり、 $1\mu\text{g}$ ～ $100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}$ ～ $50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、滅菌フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

また、B19の複製には、Ku80が寄与しているので、Ku80遺伝子の発現を抑制するアンチセンスRNAやRNAiは、B19の感染抑制に利用することができ、従って、上記感染抑制剤の場合と同様な疾患の治療又は予防に用いることができる。

本発明により、Ku80がB19のレセプターであることが明らかにされ、また、下記実施例に示すとおり、B19は、Ku80とP抗原の両者を提示する細胞によく感染してよく複製されることから、Ku80とP抗原の両者を提示するB19感染感受性細胞にB19を感染させることによ

り、B19を効率良く増殖させることができる。B19の量産は、B19の治療薬等の研究や、抗B19抗体の作製に有用である。

本発明のB19レセプター及びP抗原を提示するB19吸着性又は感染感受性細胞は、生体内のリンパ系細胞、赤芽球細胞又は細胞バンク等より入手可能な株化された細胞から選別することができる。また、遺伝子工学的的手法によりB19レセプター及びP抗原を発現させた細胞から選別することもできる。なお、ここで、「吸着性」は、細胞がB19を特異的に（すなわちレセプターとリガンドとして）吸着することを意味し、下記実施例に具体的に記載するようなELISA等の免疫測定により吸着が確認された場合に吸着性があると判定できる。また、「感染感受性」とは、B19がその細胞内で増殖する、すなわち、ウイルスのコピー数が増大することを意味し、これは下記実施例に具体的に記載するような定量的PCR法等により確認することができる。コピー数の増大が確認された場合に感染感受性があると判定できる。

B19レセプター及びP抗原を発現する細胞は、例えば、Ku80遺伝子及びP抗原関連遺伝子を細胞に導入し発現させることによって得ることができる。Ku80遺伝子は、配列番号2に示す塩基配列を有していることが知られているので、Ku80の発現は、Ku80遺伝子を常法である遺伝子工学的的手法により細胞に導入し、細胞内で発現させることにより行うことができる。一方、P抗原は糖鎖抗原であるので、P抗原の生合成に必要な一連の糖転移酵素遺伝子を細胞に導入し発現させ、細胞内でP抗原を合成させることにより行うことができる。Ku80とP抗原の両者を発現する細胞は、生体内若しくは培養条件下でP抗原を発現している細胞にKu80遺伝子を導入することによって、又は、Ku80を発現している細胞にP抗原関連遺伝子を導入することによって製造することもできるし、Ku80及びP抗原のいずれも有さない細胞に両者の遺伝子を導入することによっても製造することができる。導入する遺伝子数が少なく操作が簡便性であるという点で、P抗原を有する細胞にKu80遺伝子を導入するのが好ましい。

本発明のB19レセプター及びP抗原を提示するB19感染感受性細胞は、例えば、市販の抗Ku80抗体及び抗P抗原抗体を用いて、蛍光抗体法又はフローサイトメーター等により識別、分離することができる。B19感染感受性細胞を識別、分離する際には、抗Ku80抗体若しくは抗P抗原抗体のいずれか一方を用いて識別、分離された細胞に対して、もう一方の抗体を用いて再度同じ操作を行うこともできるが、両者の抗体を同時に反応させることによりフローサイトメーターを用いて一工程で識別、分離することもできる。

上記の工程により得られたB19レセプター及びP抗原を提示している細胞がB19の感染における感受性を有しているか否かの確認は、以下のように行うことができる。通常の培養条件下で培養された上記の細胞に、B19を添加し、一定期間培養した後、該細胞を回収する。B19が細胞に感染したことの確認は、B19の感染、増殖により細胞内で産生されるB19抗原の発現を抗B19モノクローナル抗体を用いた免疫学的手法で定性的又は定量的に検出することにより行うことができる。又は、B19の感染後、細胞内で複製されるB19遺伝子を分子生物学的手法で検出することにより行うことも可能である。

#### 実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 1. 方法

##### 1-1. 材料

##### (1) 細胞

KU812Ep6は慢性骨髄性白血病細胞株よりエリスロポエチン存在下でKU812限界希釈法によりクローニングされたB19易感染性の赤芽球系の細胞株である（特開平11-32757、文献16）。ヒトTリンパ球系細胞株H9はATCCより、ヒト単球系細胞株U937、ヒト大腸腺癌細胞株SW620、ヒト膀胱癌細胞株T24は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより分与された。KU812Ep6は10%ウシ胎児血清（FBS）、6IU/mlエリスロポエチン（Kirin Brewery）を加えたRPMI培地で、H9、U937、SW620は、10%FBS加RPMI培地で、T24は10%FBS加MEM培地で培養した。培養条件は37℃、5%CO<sub>2</sub>とした。

骨髓血単核球細胞は発熱や貧血等の検査のため骨髓検査を受けた例（造血器腫瘍を除く）から被検者の同意を得て採取した。得られた骨髓サンプルから Ficoll-Hypaque (Pharmacia) のよる比重遠心法にて骨髓血単核球を分離し、1 IU/ml エリスロポエチン (Kirin Brewery), 10%FBS 加 RPMI 培地で培養した。

#### (2) ヒトパルボウイルス B19

B19 ウイルスとして急性 B19 感染患者から採取した血清を使用した。本血清は  $2 \times 10^{14}$  コピーの B19 ウイルスを含むが、抗 B19-IgM 抗体、抗 B19-IgG 抗体はともに検出感度以下であった。対照には B19 未感染者で B19DNA、抗 B19-IgM 抗体、抗 B19-IgG 抗体ともに検出されない健康人血清を使用した。血清は使用直前まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

結合抑制実験で使用した精製 B19 ウイルスは、B19 陽性血清からカラムクロマトグラフィーで精製し、感染性を保持することが確認されたインタクトな精製 B19 ウイルスを用いた（文献 17）。

#### (3) 抗体

B19 の構造蛋白である VP1 を認識する抗体 PAR3（マウス、モノクローナル）は東北大学免疫学分野、菅村博士より供与された。Ku80 の N 末端を認識する抗 Ku80 抗体（マウス、モノクローナル）は Oncogene 社より、C 末端を認識する抗 Ku80 抗体（マウス、モノクローナル）は Pharmingen 社より得た。抗 Ku70 抗体（マウス、モノクローナル）、抗 CD106 抗体（マウス、モノクローナル）は Pharmingen 社より、抗グロボシド（P 抗原）抗体（ウサギ、ポリクローナル）である GL4 は Matreya 社より得た。1F5 はヒト抗 DNA 抗体の 08-1 イディオタイプに対する抗イディオタイプモノクローナル抗体（文献 18）で陰性コントロールとして用いた。PE 標識抗ウサギ抗体、PE 標識抗 Glycophorin A 抗体、PE 標識抗 CD3 抗体、PE 標識抗 CD20 抗体、PE 標識抗 CD14 抗体、PE 標識抗 CD56 抗体は日本ベクトン・ディッキンソン社より得た。

#### (4) リコンビナント蛋白

リコンビナント Ku80 (rKu80)、リコンビナント Ku70 (rKu70) は三森博士（京都大学）より供与された（文献 19）。Soluble CD26 (sCD26) は森本博士（東京大学）より供与された（文献 20）。リコンビナント B19 empty capsid protein (rB19ECP) はデンカ生研より分与された（文献 21、22）。

ビオチン化 rB19ECP は、rB19ECP をスルホ-LC-ビオチン (Pierce) で氷上 2 時間反応させ、ビオチン化した。ラベルされなかったスルホ-LC-ビオチンは PBS による透析で除いた。同様の方法で牛血清アルブミン (BSA) もビオチン化し、対照とした。

rB19ECP を結合したセファロース (rB19ECP-セファロース) はプロトコールに従い CNBr 活性化セファロース (Pharmacia Biotech) と rB19ECP を用いて作製した。また対照として BSA-セファロースも用意した。

#### 1-2. B19 の *in vitro* での感染

各種感染標的細胞浮遊液 ( $1 \times 10^5$  細胞/100  $\mu\text{l}$  培養液) に、 $2 \times 10^{10}$  コピーの B19 ウイルスを添加して氷上で 1 時間吸着させた。過剰な B19 を 4 回洗浄除去した後、DNA 抽出を行い、定量 PCR にて B19 コピー数を算出した。感染実験では  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  下で 2 日間培養後に DNA を抽出し、B19 ウイルス量を定量した。抑制実験においては各種抗体を B19 吸着前に氷上で 1 時間反応させた。

#### 1-3. B19DNA の測定

まず、細胞と培養液に最終濃度が 10 mM Tris (pH7.6), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5%SDS となるように DNA 抽出液を添加し、プロテアーゼ K (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で  $37^{\circ}\text{C}$ 、24 時間処理後、フェノール-クロロホルム法にて DNA 抽出を行った。抽出した DNA は 10 mM Tris (pH7.6), 0.1 mM EDTA 溶液で溶解した。

“TaqMan PCR Reagent Kit” (ロシュ社) を用いて、B19 ウイルスゲノムの構造蛋白遺伝子 VP1 領域 (nt. 2598-2752) に対する定量的 PCR により B19 のウイルス量を測定した。未知測定試料である DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) に、dUTP (400  $\mu\text{M}$ ), dATP (200  $\mu\text{M}$ ), dCTP (200  $\mu\text{M}$ ), dGTP (200  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (3.5 mM), forward プライマー (200 nM), reverse プライマー (200 nM), プローブ (100 nM), Amp Erase UNG (0.01 U/ $\mu\text{l}$ ), Ampli Taq Gold (0.025



U/ $\mu$ l), 更に TaqMan バッファー を加えて全量 50  $\mu$ l として反応させた。forward プライマーの塩基配列は 5'-coctagaaaacccatcctctgtg-3' であり, reverse プライマーのそれは 5'-aggttctgcatgactgctactgg-3' である。蛍光色素 FAM で標識された検出用プローブとして VP1 ゲノムの nt.2692-2718 を認識する 5'-tcattggacagttatctgaccacccccca-3 を用いた。増幅条件は 50°C で 2 分間, 95 °C 10 分間反応の後 95 °C で 15 秒, 60 °C で 1 分間を 40 サイクル行い, すべての反応は ABI/PRISM 7700 Sequence Detector System を用いて行った。

#### 1-4. B19 結合分子の同定

##### (1) B19 の細胞結合

PBS で浮遊した細胞にビオチン化 rB19ECP を添加し, 氷上で 30 分間反応させた。細胞を PBS にて洗浄後, アビチン-FITC (Sigma 社) を加え同様に反応させ, FACSCaliber (Becton Dickinson 社) にて解析した。

##### (2) B19 結合蛋白の同定

約  $1 \times 10^6$  の H9 細胞にスルホ-LC-ビオチン (Pierce 社) を加え室温で 30 分間反応させ, H9 細胞表面をビオチン化した。ラベルされなかったビオチンを冷 PBS で 3 回洗浄して取り除いた後, 細胞溶解液 (100 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris (pH7.6), 2 mM PMSF) で細胞を浮遊し, 4°C で 90 分間反応後, 遠心により核抽出成分を取り除き, 細胞溶解液とした。細胞溶解液とセファロースを 4°C で 24 時間ゆるやかに攪拌しながら反応させ, セファロースに非特異的に結合する蛋白を取り除いた。遠心後, 上清に rB19ECP-セファロースを加え, 4 °C で 2 時間ゆるやかに攪拌しながら反応させた。rB19ECP-セファロースを冷洗浄液 (20 mM Tris (pH7.6), 0.1 % Triton X-100, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) で 3 回洗浄後, サンプルバッファー (0.125M Tris-HCl, 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS, 10% ショ糖, 0.004% ブロムフェノールブルー) を加え 5 分間ボイルした。

rB19ECP に結合した蛋白は 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し, PVDF 膜に転写した。1% スキムミルクで室温 1 時間ブロッキングした後, アビジン-HRP を室温で 1 時間反応させ, ECL キット (Pharmacia 社) によりビオチン化蛋白を検出した。

蛋白同定用には細胞表面をビオチン化せず, 同様の方法にて細胞溶解液と rB19ECP-セファロースを反応させ, rB19ECP 結合蛋白を分離した。7.5% ゲルで電気泳動後, GBB 染色液 (0.1 % SDS, 0.25 % クマシーブリリアントブルー R250, 45 % エタノール, 10 % 酢酸溶液) にて蛋白染色を行い, 目的蛋白のゲルを切り出し, リジルエンドペプチダーゼを用いて消化した後, MALDI-TOF MS 解析に用いた。

##### (3) ウェスタンブロッティング解析

上述した方法で分離した rB19ECP 結合蛋白または抗 Ku80 抗体により免疫沈降した蛋白を PVDF 膜に転写し, 1% スキムミルクで室温 1 時間ブロッキングした。抗 Ku80 抗体を最終濃度 0.5  $\mu$ g/ml となるように 0.1% Tween20 入り PBS で希釈し, PVDF 膜に室温で 1 時間浸漬させながら反応させた。その後 0.1% tween20 入り PBS にて膜を洗浄し, 2 次抗体のペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体 (1:2000) と室温で 1 時間反応させた。化学発光の検出は ECL detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて行った。

#### 1-5. ELISA 法による結合抑制実験

酵素標識抗体測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) はパルボ (IgG-EIA" 生研" キット (デンカ生研) 中の rB19ECP を固相化したプレートを用いて行った。至適ビオチン化リコンビナント Ku80 を様々な競合物質存在下で室温 45 分間反応させた後, kit 付属の洗浄液で洗浄した。アビジン-HRP (1:1000) を添加し室温で 45 分間反応させた後, 基質を用いて検出した。陰性コントロールとして, ビオチン化 BSA を用いた。

#### 1-6. フローサイトメトリー解析

各種細胞株における B19 感染状態を把握するためにフローサイトメトリーで解析を行った。感染細胞標的細胞の培養液中に B19 陽性血清を 1:1000 の割合で添加し, 48 時間培養した後, 感染細胞を PBS で洗浄, 4% パラホルムアルデヒドで固定し, 0.1% サポニン, 0.05% NaN<sub>3</sub> を含むハンクス溶液にて細胞膜透過処理を行った。次に抗 B19-VP1 抗体 PAR3 を添加, 氷上で 30 分間反応後, PBS で洗浄し, FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (SIGMA 社) を同様に反応させた。

細胞表面の抗原検出は、PBS に浮遊させた細胞に 1 次抗体 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) を加えて、氷上で 30 分間反応させた後、細胞を PBS で洗浄し、2 次抗体である FITC 標識抗マウス IgG 抗体または PE 標識抗ウサギ抗体 (Jackson Immuno Research 社) を氷上で 30 分間反応させた。

骨髓細胞は抗 Ku80 抗体、FITC 抗マウス抗体で染色後、PE 標識モノクローナル抗体を氷上で 30 分間反応させて 2 重染色した。

すべての解析は FACSCaliber (Becton Dickinson 社) により行った。

## 1-7. 蛍光抗体染色

### (1) B19 の感染の検出

B19 陽性血清 (1:1000) 存在下で 48 時間培養した感染細胞を PBS で洗浄してスライドガラスにマウントし風乾した。アセトン-メタノール (1:1) 液で  $-20^{\circ}\text{C}$ 、20 分間固定後、抗 B19-VP1 抗体 PAR3 で  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させ、PBS で洗浄し、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体 (SIGMA 社) (1:500) を同様に反応させた。次に Avidine-FITC (1:200) を  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させた。蛍光顕微鏡で観察した。

### (2) B19ECP と KU812Ep6 との結合

KU812Ep6 細胞にビオチン化 rB19rECP を添加し、氷上で 1 時間反応させた。その後、PBS で細胞を洗浄後、抗 Ku80 抗体 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) を添加し、室温で 30 分間反応させた。次に、ビオチン化 rB19ECP を検出するために、アビジン-FITC (1:100) を、抗 Ku80 抗体を検出するために TRITC 標識抗マウス IgG 抗体 (1:50) を添加し、室温で 30 分間反応させた。染色後、細胞をスライドガラスにマウントし、蛍光顕微鏡にて観察した。

## 2 結果

### 2-1. B19 の細胞株への吸着、感染実験

まず、免疫細胞を含む各種細胞株に対する B19 の *in vitro* における感染状態を測るために B19 陽性血清を細胞株培養液に添加し 48 時間培養後、フローサイトメトリー法により細胞表面及び細胞内の B19-VP1 蛋白の検出を行った。従来より B19 感染高感受性を示すことが知られている KU812Ep6 細胞株では抗 VP1 抗体にて強陽性を示す細胞集団と弱陽性を示す集団に分離表現されることが示された (図 1)。強陽性を示す細胞集団は KU812Ep6 でのみ観察され、マクロファージ系細胞株 U937、T リンパ球系細胞系細胞株 H9 では弱陽性を示す集団のみが観察された。一方、ヒト膀胱癌細胞株 T24、ヒト大腸腺癌細胞株 SW620 では弱陽性も強陽性も観察することはできなかった。また、蛍光抗体法でこれらの細胞株における B19 構造蛋白 VP1 を検出すると、KU812Ep6 のみで強陽性細胞が観察された (図 1)。

細胞株を使用して B19 の吸着、感染について P 抗原発現との関連で検討した。KU812Ep6、U937、H9 の細胞株ではそれぞれ、1 細胞あたり 13, 9, 8 コピーの B19 の吸着がみられた。しかし T24、SW620 では 0.2 コピーの B19 DNA が検出され、B19 の吸着に各細胞間で著明な差が認められた。一方、感染実験では KU812Ep6 でのみ著明な B19 複製が観察されたが、他の細胞株では有意なコピー数の増加は認め難かった (表 1)。



表 1

細胞株	由来	細胞表面 P抗原発現	B19	
			吸着	複製
KU812Ep6	赤芽球	++	++	+++
U937	単球	—	+	± ~—
H9	T細胞	—	+	± ~—
T24	膀胱上皮癌	+	±	±
SW620	大腸腺癌	+	±	±

これらの細胞株におけるP抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、KU812Ep6、T24、SW620では細胞表面上にP抗原の発現が認められた。しかし、H9、U937ではP抗原の発現は認められなかった（図2）。B19複製はP抗原の発現が認められるKU812Ep6、T24、SW620のうちKU812Ep6でのみ観察され、P抗原の発現とB19複製が必ずしも一致しないこと、一方、P抗原発現が検出されないH9、U937細胞においてもB19吸着が観察されることからB19吸着、感染に関与するP抗原以外の分子の存在が示唆された。

#### 2-2. リコンビナント B19 エンプティカプシドプロテイン (empty capsid protein ; rB19ECP) の H9 細胞表面への結合

P 抗原の発現が認められないにもかかわらず、KU812Ep6 と同等の B19 吸着を示す T リンパ球系細胞株 H9 を用いて、rB19ECP 結合蛋白の同定を試みた。ビオチン化 rB19ECP は H9 細胞表面に濃度依存性に結合した。一方、対照であるビオチン化 BSA の H9 細胞表面への結合は観察されなかった（図3）。

#### 2-3. rB19ECP 結合蛋白の分離と同定

まず H9 細胞表面をビオチン化して、方法 4.4(2)に基づき細胞溶解液を作製した。これを rB19ECP-セファロースと反応させ、rB19ECP と結合する蛋白の分離と同定を試みた。rB19ECP-セファロースに結合、沈降した蛋白は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、80kDa 付近に観察された。一方、対照の BSA-セファロースではこの蛋白を認めなかった。この 80kDa の蛋白をリジルエンドペプチダーゼを用いてゲル内消化し、MALDI-TOF MS 法にて解析した（図4）。SwissProt と NCBI nr の 2 つのデータベースとホモロジー検索をしたところ、80kDa の蛋白は Ku80 である可能性が高いとされた。

#### 2-4. ウェスタンブロッティング解析による rB19ECP 結合蛋白の確認

rB19ECP-セファロースで沈降した 80kDa の蛋白はウェスタンブロッティング解析にて抗 Ku80 抗体と反応した。またこの蛋白は H9 細胞溶解液から抗 Ku80 抗体で免疫沈降してきた蛋白と一致しており、rB19ECP-セファロースに結合し沈降した 80kDa の蛋白が Ku80 抗原であることが証明された（図5）。

#### 2-5. B19 と Ku 抗原の結合に関する確認実験

##### 1) リコンビナント蛋白による結合抑制実験

ビオチン化 rKu80 は固相化 rB19ECP に濃度依存性に結合した（図6）。またこの結合は非標識 rKu80 により特異的に抑制され、対照である rKu70、可溶性 CD26 での抑制は観察され

なかった（図 7）。

## 2) 精製 B19 ウイルスによる結合抑制実験

ビオチン化 rKu80 の固相化 rB19ECP への結合は B19 急性感染血清から精製した B19 ウイルスでも濃度依存性に抑制された（図 8）。

## 3) 各種抗体による結合抑制実験

ビオチン化 rKu80 の固相化 rB19ECP への結合は抗 Ku80 抗体では抑制されたが、抗 Ku70 抗体、抗 CD106 抗体では抑制されなかった（図 9）。また抗 Ku80 抗体による抑制は濃度依存性であった（図 10）。

## 2-6. 各細胞株表面における Ku80 抗原の発現

フローサイトメトリー解析により、KU812Ep6, H9, U937 細胞株の細胞表面上に Ku80 抗原の発現が観察された。一方、T24, SW620 では細胞表面上の Ku80 発現は認められなかった（図 11、表 2）。

表 2

細胞株	由来	細胞表面 P抗原発現	B19		細胞表面 Ku80抗原発現
			吸着	複製	
KU812Ep6	赤芽球	++	++	+++	+
U937	単球	—	+	± ~ —	+
H9	T細胞	—	+	± ~ —	+
T24	膀胱上皮癌	+	±	±	—
SW620	大腸腺癌	+	±	±	—

## 2-7. KU812Ep6細胞へのB19 の結合とKu80の発現

蛍光抗体染色を用いて、KU812Ep6 細胞への rB19ECP の結合と細胞表面上の Ku80 発現の検出を試みた。共焦点にて、rB19ECP と Ku80 の局在が一致している細胞が観察された（図 4 の B）。

## 2-8. B19 感染における P 抗原と Ku 抗原

同定された Ku 抗原の B19 感染における役割を検討するために P 及び Ku 抗原を発現し、B19 複製能を有する KU812Ep6 を用いて、B19 吸着と感染実験で特異抗体の作用を検討した。KU812Ep6 への B19 吸着は、抗 Ku80 抗体により有意な抑制が認められたが、抗グロボシド抗体での抑制は明らかでなかった（図 12）。一方、2 日間培養した後、細胞内での B19 複製を定量 PCR にて検出したところ、抗 Ku80 抗体、抗グロボシド（P 抗原）抗体存在下で、共に B19 の複製は抑制された。また、両抗体同時存在下では、B19 複製の抑制率は高められた（図 13）。

## 2-9. 骨髓血中での Ku80 抗原の発現

Ku80 抗原が *in vivo* で B19 の増殖細胞を含む骨髓細胞で発現しているか、骨髓血中の細胞表面 Ku80 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。その結果 Ku80 は Glycophorin A を発現している赤芽球系の細胞で強い発現が認められた。さらに B 細胞、T 細胞、単球の細胞表面マーカーである、CD20、CD3、CD14 陽性細胞においても Ku80 の発現が認められた（図 14）。

## 2-10. 骨髓細胞での B19 感染と P 及び Ku 抗原

骨髓サンプルを用いて、細胞株と同様に B19 感染による Ku80 及び P の関与様式を求めた。抗 Ku80 抗体、抗グロボシド抗体存在下で、それぞれ、99.0%、99.9%の B19 ウイルスの複製が抑えられた。なお抗 Ku80 抗体、抗グロボシド抗体の両抗体を同時に添加しても、抗 Ku80 抗体、抗グロボシド抗体単独時に比べて、複製の抑制率に有意な相乗効果は認められなかった（表 3）。

表 3

細胞	抗体	B19-DNA のコピー数
BM	(-)	$1041.5 \times 10^4$
BM	抗-CD106 抗体	$568.2 \times 10^4$
BM	抗-Ku80 抗体	$10.2 \times 10^4$ *
BM	GL4	$0.19 \times 10^4$ *
BM	抗-Ku80 抗体 GL4	$0.18 \times 10^4$ *

\*  $P < 0.01$ 

### 3. 考察

本研究で、B19 の細胞表面結合に関連して P 抗原とは異なる B19 感染関連分子として Ku80 を特定した。Ku80 は、B19 の吸着が観察されるものの P 抗原発現が認められない T リンパ球系細胞株 H9 からリコンビナント B19 エンプティカプシドプロテイン (empty capsid protein ; rB19ECP) に結合する分子として沈降し、MALDI-TOF MS 法解析にて特定した。H9 細胞における B19 吸着は抗 Ku80 抗体  $5 \mu\text{g/ml}$  存在下で 60%抑制され(成績提示せず)、また抗 Ku80 抗体を用いたウェスタンブロット法において rB19ECP 結合分子は抗 Ku80 抗体と反応した。さらに、rB19ECP と rKu80 を用いた競合 ELISA 法の結果より、rB19ECP への結合分子が Ku80 であり、B19 と Ku80 の結合が特異的であることが示された。

Ku80 は SLE 例で認められる自己抗体の標的自己抗原として見いだされた 80kDa の蛋白である。Ku80 は細胞内蛋白として局在し、機能することが知られている。Ku80 は、Ku70 とヘテロダイマーを形成し(文献 19)、細胞内で DNA 依存性プロテインキナーゼの調節因子として DNA 修復や組換えに関与するとされている(文献 23、24)。一方 Ku80 は、低酸素環境下で血管内皮細胞やヒト筋肉腫細胞株 RD 細胞表面に発現が認められるようになり、リンパ球系細胞の接着に関係しているとの報告もある(文献 25、26、27)。またヒト胃癌細胞株 HGT-1 細胞表面に発現している Ku80 はソマトスタチンレセプターとして機能し、シグナル伝達に関与することが報告されている(文献 28)。以上の報告にみられるように、Ku80 は細胞表面で発現し、機能を有する場合が知られている。

本研究では、B19 の吸着が観察された Ku812Ep6、H9、U937 のいずれにおいても細胞表面に Ku80 の発現が認められた。H9、U937 では B19 レセプター P 抗原は検出されなかったことから、これらの細胞株での B19 吸着には Ku80 が重要な役割を担っていると推定された。さ

らに、生体由来血液細胞での Ku80 の発現を解析したところ、末梢血単核細胞では細胞表面に抗 Ku80 抗体で検出可能な Ku80 の発現を確認できる細胞集団は確認できなかった（成績提示せず）。しかし、骨髓由来細胞ではそれぞれ、赤芽球、単球、T 細胞、B 細胞、のマーカである GlycophorinA 陽性細胞、CD14 陽性細胞、CD3 陽性細胞、CD20 陽性細胞などで細胞表面に Ku80 の発現を認めた。これらの細胞表面で Ku80 が発現しているのは骨髓細胞が存在する生理環境が低酸素環境であることと関連があるのかもしれない。骨髓内での酸素分圧は 5~7%O<sub>2</sub> (37~52mmHg) の状態とされている（文献 29、30）。最近、B19 の感染複製が低酸素環境下で亢進するとの事実も報告されている（文献 31）。また、低酸素下での B19 感染複製亢進のメカニズムは現時点で不明であるが、骨髓などの低酸素環境で、本来細胞内に局在する Ku80 が細胞表面に表出されるために B19 感染効率が増加し B19 の複製亢進に至る可能性があげられる。

細胞内蛋白である Ku80 がどのような条件下で、どのようなメカニズムで細胞表面に表出されるようになるかは未だ、不明な部分が多く、細胞表面への Ku80 発現メカニズムを理解することは B19 感染を理解するうえで重要であり、さらなる研究が必要である。

さらに B19 感染感受性細胞株 Ku812Ep6 を用いた B19 吸着、感染抑制実験により B19 感染における Ku80 の役割を検討した。抗 Ku80 抗体存在下でのみ B19 吸着の抑制が観察された。B19 複製抑制効果は抗 Ku80 抗体、抗グロボシド抗体存在下で、各々約 20%、40%であった。抗グロボシド抗体の作用の相違が観察されたが、この理由として抗グロボシド抗体量が B19 とグロボシドの結合を十分に抑制し得る濃度に達していなかった可能性があげられる。しかし、競合 ELISA 法により B19 と Ku80 の結合はグロボシドでは抑制されず、Ku80 とグロボシドにつき B19 は結合部位が異なると考えられる。このことから、抗グロボシド抗体によりグロボシドと結合し得なかった B19 が Ku80 と結合したため、見かけ上、B19 吸着コピー数に変化が認められなかった可能性も考えられる。一方、感染実験では抗グロボシド抗体による B19 複製抑制が認められている。これはグロボシドを介した B19 感染効率が Ku80 を介した感染効率に比して高いことを示すものと推定される。また、抗 Ku80 抗体及び抗グロボシド抗体の両存在下では B19 複製抑制効果は、約 60%にまで高められ、抗 Ku80 抗体が抗グロボシド抗体に対して相乗的抑制効果を示した。

骨髓細胞を用いた B19 感染実験においては、抗 Ku80 抗体単独での B19 複製抑制は 99.0%であった。この抑制率は抗グロボシド抗体を加えた時と同程度であった。細胞株を用いて実験で認められた抗グロボシド抗体、抗 Ku80 抗体の両抗体存在下での B19 増殖抑制相乗効果は観察されなかったが、これは骨髓細胞におけるグロボシド、Ku80 抗原の発現量の違い、さらにグロボシド、Ku80 各々の B19 感染効率の違いによる可能性があげられる。骨髓赤芽球系細胞はグロボシドを高発現している。また図 4 の C、図 4 の D の結果からグロボシドを介した B19 感染効率は Ku80 を介した感染より高いことが示唆されることから、骨髓細胞を用いた感染実験の結果は主にグロボシドを介した赤芽球細胞へ B19 感染を反映したものと考えられる。従って、抗グロボシド抗体下では、赤芽球細胞への主な B19 感染が効率よく抑制され、Ku80 の B19 感染への関わりを観察し難い条件になったものと考えられる。

表 1 の結果から、B19 が Ku80 単独陽性細胞に吸着し、グロボシド陽性細胞でも Ku80 発現陰性の場合では B19 吸着が少ないこと、かつ細胞株を用いた実験において、抗 Ku80 抗体単独で B19 吸着抑制が観察されることより、Ku80 は B19 吸着に重要な役割を果たすと考えられる。さらに細胞株及び骨髓細胞を用いた感染実験において抗 Ku80 抗体単独で B19 複製抑制が観察されたこと、抗 Ku80 抗体は抗グロボシド抗体に対して相乗的抑制効果として作用しうることなどから、細胞表面上の Ku80 発現は B19 感染に影響を及ぼし、B19 感染を規定する可能性がある。つまり Ku80 は B19 感染関連分子として機能し、B19 感染レセプターあるいは感染効率を高める co-receptor の役割を果たすものと推定される。

本発明では Ku80 が生体内で骨髓中の赤芽球系細胞以外にも、T 細胞、B 細胞、単球表面上に発現されることを示した。我々はこれまでに、関節リウマチ例の関節滑膜組織中の免疫細胞で、B19DNA、RNA、B19-VP 蛋白が検出できることを報告してきた<sup>10</sup>。これらの細胞では P 抗原の発現は乏しいとされているので、B19 の免疫細胞への感染には Ku80 が重要な役割を担っている可能性がある。Ku80 を介した B19 感染様式の存在はこれまで赤芽球と B19

の関連のみでは理解が困難であった B19 感染症の様々な病態の理解に貢献するのみならず、B19 感染症の診断・治療にも有用な情報をもたらすものと期待される。

- 文献1: Plummer FA, Hammond GW, Forward K, Sekla L, Thompson LM, Jones SE, Kidd IM, Anderson MJ: An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. *N Engl. J. Med.* 1985, 313: 74-9.
- 文献2: Anand, A., Gray, E.S., Brown, T., Clewley J.P., Cohen, B.J: Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. *N Engl. J. Med.* 1987, 316: 183-186.
- 文献3: Kelleher, J.F., Luban, N.L., Mortimer, P.P., Kamimura, T: Human serum "parvovirus": a specific cause of aplastic crisis in children with hereditary spherocytosis. *J. Pediatr.* 1983, 102: 720-722.
- 文献4: White DG, Woolf AD, Mortimer PP, Cohen BJ, Blake DR, Bacon PA: Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1985, 233: 419-21.
- 文献5: Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* 1985, Feb 23: 422-5.
- 文献6: Brown, K.E., Anderson, S.M., & Young, N.S: Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993, 262: 114-117.
- 文献7: Brown, K.E. *et al*: Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med.* 1994, 330: 1192-1196.
- 文献8: Barlow, G.D., & McKendrick, M.W. Parvovirus B19 causing leucopenia and neutropenia in a healthy adult. *J Infect.* 2000, 40: 192-195.
- 文献9: Woolf, A.D., Campion, G.V., Chishick, A., Wise, S., Cohen, B.J., Klouda, P.T., Caul, O., Dieppe, P.A: Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med.* 1989, 149: 1153-1156.
- 文献10: Takahashi, Y., Murai, G., Shibata, S., Munakata, Y., Ishii, T., Ishii, K., Saitoh, T., Sawai, T., Sugamura, K., Sasaki, T: Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998, 95: 8227-8232.
- 文献11: Stahl, H.D., Pfeiffer, R., von Salis-Soglio, G., Emmrich, F: Parvovirus B19-associated mono- and oligoarticular arthritis may evolve into a chronic inflammatory arthropathy fulfilling criteria for rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. *Clin. Rheumatol.* 2000, 19: 510-511.
- 文献12: Weigel-Kelley, K.A., Yoder, M.C., & Srivastava, A: Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol.* 2001, 75: 4110-4116.
- 文献13: Doranz, B.J., Berson, J.F., Rucker, J., & Doms, R.W: Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol Res.* 1997, 16: 15-28.
- 文献14: Bergelson, J.M., Shepley, M.P., Chan, B.M., Hemler, M.E., & Finberg, R.W: Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* 1992, 255: 1718-1720.
- 文献15: Summerford, C., Bartlett, J.S., & Samulski, R.J: AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 1999, 5: 78-82.
- 文献16: Miyagawa, E., Yoshida, T., Takahashi, H., Yamaguchi, K., Nagano, T., Kiriya, Y., Okochi, K., Sato, H: Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J. Virol. Methods* 1999, 83: 45-54.
- 文献17: Yamaguchi K, Miyagawa E, Dan M, Miyazaki T, Ikeda H: Cellulose hollow fibers (BMMS) used in the filter membrane can trap human parvovirus (B19). *Electron Microscopy* 2002, 2: 115-116

- 文献18: Muryoi, T., Sasaki, T., Tamate, E., Takai, O., Harata, N., Yoshinaga, K: Antigen inhibition of the interaction between murine monoclonal anti-idiotypic antibodies and human monoclonal anti-DNA antibodies. *Tohoku J. Exp. Med.* 1987, 152: 253-258.
- 文献19: Mimori, T. *et al*: Isolation and characterization of cDNA encoding the 80-kDa subunit protein of the human autoantigen Ku (p70/p80) recognized by autoantibodies from patients with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1990, 87: 1777-1781.
- 文献20: Tanaka, T. *et al*: Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, 91: 3082-3086.
- 文献21: Brown, C.S., Salimans, M.M., Noteborn, M.H., & Weiland, H.T: Antigenic parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a baculovirus expression system. *Virus Res.* 1999, 15: 197-211.
- 文献22: Kajigaya, S. *et al*: Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1991, 88: 4646-4650.
- 文献23: Nussenzweig, A. *et al*: Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 1996, 382: 551-555.
- 文献24: Finnie, N.J., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Jeggo, P.A., & Jackson, S.P: DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995, 92: 320-324.
- 文献25: Lynch, E.M., Moreland, R.B., Ginis, I., Perrine, S.P., & Faller, D.V: Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001, 280: 897-911.
- 文献26: Ginis, I., & Faller, D.V: Hypoxia affects tumor cell invasiveness in vitro: the role of hypoxia-activated ligand HAL1/13 (Ku86 autoantigen). *Cancer Lett.* 2000, 154: 163-174.
- 文献27: Teoh, G. *et al*: The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. *J. Clin. Invest.* 1998, 101: 1379-1388.
- 文献28: Le Romancer M, Reyl-Desmars F, Cherifi Y, Pigeon C, Bottari S, Meyer O, Lewin MJ: The 86-kDa subunit of autoantigen Ku is a somatostatin receptor regulating protein phosphatase-2A activity. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 17464-8.
- 文献29: Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET: Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* 2000, 111: 879-89.
- 文献30: Hevehan DL, Papoutsakis ET, Miller WM: Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis. *Exp. Hematol.* 2000, 28: 267-75.
- 文献31: Sylvie Pillet, Nathalie Le Guyader, *et al*. Hypoxia up regulation the expression of human parvovirus B19. IX parvovirus workshop (2002 Italy)
- 文献32: 特開平11-32757号公報
- 文献33: Sakata H. *et al*. *Vox Sang.* 77(4), 197-B203, 1999)



## SEQUENCE LISTING

<110> Yasuhiko MUNAKATA et al.  
 <120> Novel human parvovirus B19 receptor and uses thereof  
 <130>  
 <160> 5

<210> 1  
 <211> 732  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

```

Met Val Arg Ser Gly Asn Lys Ala Ala Val Val Leu Cys Met Asp Val
1          5          10          15
Gly Phe Thr Met Ser Asn Ser Ile Pro Gly Ile Glu Ser Pro Phe Glu
          20          25          30
Gln Ala Lys Lys Val Ile Thr Met Phe Val Gln Arg Gln Val Phe Ala
          35          40          45
Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ala Leu Val Leu Phe Gly Thr Asp Gly Thr
          50          55          60
Asp Asn Pro Leu Ser Gly Gly Asp Gln Tyr Gln Asn Ile Thr Val His
65          70          75          80
Arg His Leu Met Leu Pro Asp Phe Asp Leu Leu Glu Asp Ile Glu Ser
          85          90          95
Lys Ile Gln Pro Gly Ser Gln Gln Ala Asp Phe Leu Asp Ala Leu Ile
          100          105          110
Val Ser Met Asp Val Ile Gln His Glu Thr Ile Gly Lys Lys Phe Glu
          115          120          125
Lys Arg His Ile Glu Ile Phe Thr Asp Leu Ser Ser Arg Phe Ser Lys
          130          135          140
Ser Gln Leu Asp Ile Ile Ile His Ser Leu Lys Lys Cys Asp Ile Ser
145          150          155          160
Leu Gln Phe Phe Leu Pro Phe Ser Leu Gly Lys Glu Asp Gly Ser Gly
          165          170          175
Asp Arg Gly Asp Gly Pro Phe Arg Leu Gly Gly His Gly Pro Ser Phe
          180          185          190
Pro Leu Lys Gly Ile Thr Glu Gln Gln Lys Glu Gly Leu Glu Ile Val
          195          200          205
Lys Met Val Met Ile Ser Leu Glu Gly Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ile
          210          215          220
Tyr Ser Phe Ser Glu Ser Leu Arg Lys Leu Cys Val Phe Lys Lys Ile
225          230          235          240
Glu Arg His Ser Ile His Trp Pro Cys Arg Leu Thr Ile Gly Ser Asn
          245          250          255
Leu Ser Ile Arg Ile Ala Ala Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Arg Val
          260          265          270
Lys Lys Thr Trp Thr Val Val Asp Ala Lys Thr Leu Lys Lys Glu Asp
          275          280          285
Ile Gln Lys Glu Thr Val Tyr Cys Leu Asn Asp Asp Asp Glu Thr Glu
          290          295          300
Val Leu Lys Glu Asp Ile Ile Gln Gly Phe Arg Tyr Gly Ser Asp Ile

```

305                      310                      315                      320  
 Val Pro Phe Ser Lys Val Asp Glu Glu Gln Met Lys Tyr Lys Ser Glu  
                                  325                      330                      335  
 Gly Lys Cys Phe Ser Val Leu Gly Phe Cys Lys Ser Ser Gln Val Gln  
                                  340                      345                      350  
 Arg Arg Phe Phe Met Gly Asn Gln Val Leu Lys Val Phe Ala Ala Arg  
                                  355                      360                      365  
 Asp Asp Glu Ala Ala Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile His Ala Leu  
                                  370                      375                      380  
 Asp Asp Leu Asp Met Val Ala Ile Val Arg Tyr Ala Tyr Asp Lys Arg  
 385                      390                      395                      400  
 Ala Asn Pro Gln Val Gly Val Ala Phe Pro His Ile Lys His Asn Tyr  
                                  405                      410                      415  
 Glu Cys Leu Val Tyr Val Gln Leu Pro Phe Met Glu Asp Leu Arg Gln  
                                  420                      425                      430  
 Tyr Met Phe Ser Ser Leu Lys Asn Ser Lys Lys Tyr Ala Pro Thr Glu  
                                  435                      440                      445  
 Ala Gln Leu Asn Ala Val Asp Ala Leu Ile Asp Ser Met Ser Leu Ala  
                                  450                      455                      460  
 Lys Lys Asp Glu Lys Thr Asp Thr Leu Glu Asp Leu Phe Pro Thr Thr  
 465                      470                      475                      480  
 Lys Ile Pro Asn Pro Arg Phe Gln Arg Leu Phe Gln Cys Leu Leu His  
                                  485                      490                      495  
 Arg Ala Leu His Pro Arg Glu Pro Leu Pro Pro Ile Gln Gln His Ile  
                                  500                      505                      510  
 Trp Asn Met Leu Asn Pro Pro Ala Glu Val Thr Thr Lys Ser Gln Ile  
                                  515                      520                      525  
 Pro Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Phe Pro Leu Ile Glu Ala Lys Lys  
                                  530                      535                      540  
 Lys Asp Gln Val Thr Ala Gln Glu Ile Phe Gln Asp Asn His Glu Asp  
 545                      550                      555                      560  
 Gly Pro Thr Ala Lys Lys Leu Lys Thr Glu Gln Gly Gly Ala His Phe  
                                  565                      570                      575  
 Ser Val Ser Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Thr Ser Val Gly Ser Val  
                                  580                      585                      590  
 Asn Pro Ala Glu Asn Phe Arg Val Leu Val Lys Gln Lys Lys Ala Ser  
                                  595                      600                      605  
 Phe Glu Glu Ala Ser Asn Gln Leu Ile Asn His Ile Glu Gln Phe Leu  
                                  610                      615                      620  
 Asp Thr Asn Glu Thr Pro Tyr Phe Met Lys Ser Ile Asp Cys Ile Arg  
 625                      630                      635                      640  
 Ala Phe Arg Glu Glu Ala Ile Lys Phe Ser Glu Glu Gln Arg Phe Asn  
                                  645                      650                      655  
 Asn Phe Leu Lys Ala Leu Gln Glu Lys Val Glu Ile Lys Gln Leu Asn  
                                  660                      665                      670  
 His Phe Trp Glu Ile Val Val Gln Asp Gly Ile Thr Leu Ile Thr Lys  
                                  675                      680                      685  
 Glu Glu Ala Ser Gly Ser Ser Val Thr Ala Glu Glu Ala Lys Lys Phe  
                                  690                      695                      700  
 Leu Ala Pro Lys Asp Lys Pro Ser Gly Asp Thr Ala Ala Val Phe Glu

705	710	17 715	720
Glu Gly Gly Asp Val	Asp Asp Leu Leu	Asp Met Ile	
725	730		

<210> 2  
 <211> 3304  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

cgaccaaagc gcctgaggac cggcaao atg gtg ogg tgc ggg aat aag goa gct	54
Met Val Arg Ser Gly Asn Lys Ala Ala	
1 5	

  

gtt gtg otg tgt atg gac gtg ggc ttt acc atg agt aac tcc att cct	102
Val Val Leu Cys Met Asp Val Gly Phe Thr Met Ser Asn Ser Ile Pro	
10 15 20 25	

  

ggt ata gaa tcc cca ttt gaa caa goa aag aag gtg ata acc atg ttt	150
Gly Ile Glu Ser Pro Phe Glu Gln Ala Lys Lys Val Ile Thr Met Phe	
30 35 40	

  

gta cag cga cag gtg ttt gct gag aac aag gat gag att gct tta gtc	198
Val Gln Arg Gln Val Phe Ala Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ala Leu Val	
45 50 55	

  

ctg ttt ggt aca gat ggc act gac aat ccc ctt tct ggt ggg gat cag	246
Leu Phe Gly Thr Asp Gly Thr Asp Asn Pro Leu Ser Gly Gly Asp Gln	
60 65 70	

  

tat cag aac atc aca gtg cao aga cat ctg atg cta cca gat ttt gat	294
Tyr Gln Asn Ile Thr Val His Arg His Leu Met Leu Pro Asp Phe Asp	
75 80 85	

  

ttg ctg gag gao att gaa ago aaa atc caa cca ggt tct caa cag gct	342
Leu Leu Glu Asp Ile Glu Ser Lys Ile Gln Pro Gly Ser Gln Gln Ala	
90 95 100 105	

  

gac ttc ctg gat gca cta atc gtg agc atg gat gtg att caa cat gaa	390
Asp Phe Leu Asp Ala Leu Ile Val Ser Met Asp Val Ile Gln His Glu	
110 115 120	

  

aca ata gga aag aag ttt gag aag agg cat att gaa ata ttc act gac	438
Thr Ile Gly Lys Lys Phe Glu Lys Arg His Ile Glu Ile Phe Thr Asp	
125 130 135	

  

ctc ago ago cga ttc ago aaa agt cag ctg gat att ata att cat ago	486
Leu Ser Ser Arg Phe Ser Lys Ser Gln Leu Asp Ile Ile Ile His Ser	
140 145 150	

  

ttg aag aaa tgt gac atc tcc ctg caa ttc ttc ttg cct ttc tca ctt	534
---	-----

Leu Lys Lys Cys Asp Ile Ser Leu Gln Phe Phe Leu Pro Phe Ser Leu			
155	160	165	
ggc aag gaa gat gga agt ggg gac aga gga gat ggc ccc ttt cgc tta	582		
Gly Lys Glu Asp Gly Ser Gly Asp Arg Gly Asp Gly Pro Phe Arg Leu			
170	175	180	185
ggt ggc cat ggg cct too ttt cca cta aaa gga att aoc gaa cag caa	630		
Gly Gly His Gly Pro Ser Phe Pro Leu Lys Gly Ile Thr Glu Gln Gln			
190	195	200	
aaa gaa ggt ott gag ata gtg aaa atg gtg atg ata tct tta gaa ggt	678		
Lys Glu Gly Leu Glu Ile Val Lys Met Val Met Ile Ser Leu Glu Gly			
205	210	215	
gaa gat ggg ttg gat gaa att tat toa ttc agt gag agt ctg aga aaa	726		
Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ile Tyr Ser Phe Ser Glu Ser Leu Arg Lys			
220	225	230	
ctg tgc gtc ttc aag aaa att gag agg cat too att cao tgg occ tgc	774		
Leu Cys Val Phe Lys Lys Ile Glu Arg His Ser Ile His Trp Pro Cys			
235	240	245	
oga ctg acc att ggc tcc aat ttg tot ata agg att goa gcc tat aaa	822		
Arg Leu Thr Ile Gly Ser Asn Leu Ser Ile Arg Ile Ala Ala Tyr Lys			
250	255	260	265
tog att cta cag gag aga gtt aaa aag act tgg aca gtt gtg gat goa	870		
Ser Ile Leu Gln Glu Arg Val Lys Lys Thr Trp Thr Val Val Asp Ala			
270	275	280	
aaa acc cta aaa aaa gaa gat ata caa aaa gaa aca gtt tat tgc tta	918		
Lys Thr Leu Lys Lys Glu Asp Ile Gln Lys Glu Thr Val Tyr Cys Leu			
285	290	295	
aat gat gat gat gaa act gaa gtt tta aaa gag gat att att caa ggg	966		
Asn Asp Asp Asp Glu Thr Glu Val Leu Lys Glu Asp Ile Ile Gln Gly			
300	305	310	
ttc cgc tat gga agt gat ata gtt cct ttc tct aaa gtg gat gag gaa	1014		
Phe Arg Tyr Gly Ser Asp Ile Val Pro Phe Ser Lys Val Asp Glu Glu			
315	320	325	
caa atg aaa tat aaa tog gag ggg aag tgc ttc tct gtt ttg gga ttt	1062		
Gln Met Lys Tyr Lys Ser Glu Gly Lys Cys Phe Ser Val Leu Gly Phe			
330	335	340	345
tgt aaa tct tct cag gtt cag aga aga ttc ttc atg gga aat caa gtt	1110		
Cys Lys Ser Ser Gln Val Gln Arg Arg Phe Phe Met Gly Asn Gln Val			
350	355	360	

cta aag gtc ttt gca gca aga gat gat gag gca gct gca gtt gca ott Leu Lys Val Phe Ala Ala Arg Asp Asp Glu Ala Ala Ala Val Ala Leu 365 370 375	1158
tcc tcc ctg att cat gct ttg gat gac tta gac atg gtg gcc ata gtt Ser Ser Leu Ile His Ala Leu Asp Asp Leu Asp Met Val Ala Ile Val 380 385 390	1206
oga tat got tat gac aaa aga gct aat cct caa gtc ggc gtg gct ttt Arg Tyr Ala Tyr Asp Lys Arg Ala Asn Pro Gln Val Gly Val Ala Phe 395 400 405	1254
cct cat atc aag cat aac tat gag tgt tta gtg tat gtg cag ctg cct Pro His Ile Lys His Asn Tyr Glu Cys Leu Val Tyr Val Gln Leu Pro 410 415 420 425	1302
ttc atg gaa gac ttg cgg caa tac atg ttt tca tcc ttg aaa aac agt Phe Met Glu Asp Leu Arg Gln Tyr Met Phe Ser Ser Leu Lys Asn Ser 430 435 440	1350
aag aaa tat got ccc acc gag goa cag ttg aat got gtt gat gct ttg Lys Lys Tyr Ala Pro Thr Glu Ala Gln Leu Asn Ala Val Asp Ala Leu 445 450 455	1398
att gac tcc atg agc ttg gca aag aaa gat gag aag aca gac acc ctt Ile Asp Ser Met Ser Leu Ala Lys Lys Asp Glu Lys Thr Asp Thr Leu 460 465 470	1446
gaa gac ttg ttt cca acc acc aaa atc cca aat cct cga ttt cag aga Glu Asp Leu Phe Pro Thr Thr Lys Ile Pro Asn Pro Arg Phe Gln Arg 475 480 485	1494
tta ttt cag tgt ctg ctg cac aga got tta cat ccc cgg gag cct cta Leu Phe Gln Cys Leu Leu His Arg Ala Leu His Pro Arg Glu Pro Leu 490 495 500 505	1542
ccc cca att cag cag cat att tgg aat atg ctg aat cct ccc got gag Pro Pro Ile Gln Gln His Ile Trp Asn Met Leu Asn Pro Pro Ala Glu 510 515 520	1590
gtg aca aca aaa agt cag att cct ctc tct aaa ata aag acc ctt ttt Val Thr Thr Lys Ser Gln Ile Pro Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Phe 525 530 535	1638
cct ctg att gaa gcc aag aaa aag gat caa gtg act got cag gaa att Pro Leu Ile Glu Ala Lys Lys Lys Asp Gln Val Thr Ala Gln Glu Ile 540 545 550	1686
ttc caa gac aac cat gaa gat gga cct aca gct aaa aaa tta aag act	1734

gag caa ggg gga gcc cac ttc agc gtc tcc agt ctg got gaa ggc agt 1782  
Glu Gln Gly Gly Ala His Phe Ser Val Ser Ser Leu Ala Glu Gly Ser  
570 575 580 585

gtc acc tot gtt gga agt gtg aat oct gct gaa aac ttc cgt gtt cta 1830  
Val Thr Ser Val Gly Ser Val Asn Pro Ala Glu Asn Phe Arg Val Leu  
590 595 600

gtg aaa cag aag aag gcc agc ttt gag gaa gog agt aac cag ctc ata 1878  
Val Lys Gln Lys Lys Ala Ser Phe Glu Glu Ala Ser Asn Gln Leu Ile  
605 610 615

aat cac atc gaa cag ttt ttg gat act aat gaa aca ccg tat ttt atg 1926  
Asn His Ile Glu Gln Phe Leu Asp Thr Asn Glu Thr Pro Tyr Phe Met  
620 625 630

aag agc ata gac tgc atc oga gcc ttc cgg gaa gaa gcc att aag ttt 1974  
Lys Ser Ile Asp Cys Ile Arg Ala Phe Arg Glu Glu Ala Ile Lys Phe  
635 640 645

tca gaa gag cag cgc ttt aac aac ttc ctg aaa ggc ott caa gag aaa 2022  
Ser Glu Glu Gln Arg Phe Asn Asn Phe Leu Lys Ala Leu Gln Glu Lys  
650 655 660 665

gtg gaa att aaa caa tta aat cat ttc tgg gaa att gtt gtc cag gat 2070  
Val Glu Ile Lys Gln Leu Asn His Phe Trp Glu Ile Val Val Gln Asp  
670 675 680

gga att act ctg atc acc aaa gag gaa gcc tct gga agt tct gtc aca 2118  
Gly Ile Thr Leu Ile Thr Lys Glu Glu Ala Ser Gly Ser Ser Val Thr  
685 690 695

gct gag gaa gcc aaa aag ttt ctg gcc ccc aaa gac aaa cca agt gga 2166  
Ala Glu Glu Ala Lys Lys Phe Leu Ala Pro Lys Asp Lys Pro Ser Gly  
700 705 710

gac aca gca gct gta ttt gaa gaa ggt ggt gat gtg gac gat tta ttg 2214  
Asp Thr Ala Ala Val Phe Glu Glu Gly Gly Asp Val Asp Asp Leu Leu  
715 720 725

gac atg ata tag gtcgtggatg tatggggaat ctaagagagc tgccatogct 2266  
Asp Met Ile  
730

gtgatgotgg gagttctaac aaaacaagtt ggatgcggcc attcaagggg agocaaaatc 2326  
toaagaaatt cccagcaggt tacctggagg cggatcatot aattctotgt ggaatgaata 2386  
cacacatata tattacaagg gataatttag accccataca agtttataaa gagtcattgt 2446



tat	ttttctg	g	ttggtgtatt	at	ttttttotg	tg	gttcttact	ga	tcttttgta	tattacatac	2506
at	gctttgaa	g	ttttctggaa	ag	tagatctt	tt	cttgacct	ag	tatatcag	tgacagttgc	2566
ag	ccottgtg	at	gtgattag	tg	tctcatgt	gg	aaccatgg	ca	tggttatt	gatgagtttc	2626
tt	aaoocttt	cc	agagtcct	cc	tttgctg	at	ctccaac	ag	ctgtcaca	acttggttg	2686
ag	caagcagt	ag	catttgct	tc	ctccaac	aa	gcagotgg	gt	taggaaaa	ccatgggtaa	2746
gg	acggaoto	ao	ttctttt	tt	agttgagg	cc	ttctagtt	ac	cacattac	tctgcctotg	2806
ta	tatagggtg	gt	ttttcttta	ag	tgggggtg	ga	aggggagc	ac	aatttccc	ttcatactcc	2866
tt	taagoag	tg	agttatgg	tg	gtgggtctc	at	gaagaaaa	ga	ctttttgg	cccaatctot	2926
gc	atatoag	tg	aaccttta	ga	aactcaaa	aa	ctgagaaa	tt	tacttcag	tagttagaat	2986
ta	tatoactt	ca	ctgttctc	ta	cttgcaag	cc	tcaagag	ag	aaagttto	gttatattaa	3046
aa	cacttagg	ta	acttttctg	gt	ottttocaa	tt	tctacota	ag	tcagcttt	catctttgtg	3106
ga	tgggtgtct	cc	tttactaa	at	aagaaaaat	aa	caaaagccc	tt	attctctt	tttttcttgt	3166
cc	toattctt	gc	cttgagtt	cc	agttctctc	tt	tggtgtac	ag	acttcttg	gtaccagtc	3226
ac	ctctgtct	tc	agcaccct	ca	taagtcgt	ca	ctaataca	ca	gttttgta	catgtaacat	3286
taa	aggcata	aa	tgactc								3304

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide primer for real-time detection PCR

&lt;400&gt; 3

ccctagaaaa cccatctctg

23

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide primer for real-time detection PCR

&lt;400&gt; 4

aggttctgca tgactgotac tgg

23

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide probe for real-time detection PCR

&lt;400&gt; 5

tcatggacag ttatctgacc accccca

27

We claim:

1. 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該配列において少数のアミノ酸残基が置換し若しくは欠失し、若しくは該配列に少数のアミノ酸残基が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有しヒトパルボウイルスB19と結合するタンパク質から成る、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプター。
2. 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該配列において1個ないし数個のアミノ酸残基が置換し若しくは欠失し、若しくは該配列に1個ないし数個のアミノ酸残基が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有しヒトパルボウイルスB19と結合するタンパク質から成る、請求項1記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプター。
3. 前記タンパク質は、配列番号1記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項1記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプター。
4. 前記タンパク質は、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプター。
5. 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプター又はそのウイルス結合性断片から成るヒトパルボウイルスB19結合剤。
6. 請求項5記載の結合剤を含んで成るヒトパルボウイルスB19測定用試薬。
7. 請求項5記載の結合剤を含んで成るヒトパルボウイルスB19吸着剤。
8. 請求項5記載の結合剤を含んで成るヒトパルボウイルスB19の感染抑制剤。
9. 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターとヒトパルボウイルスB19の結合を阻害する物質を有効成分として含有するヒトパルボウイルスB19の感染抑制剤。
10. 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を有効成分として含有する請求項9記載の感染抑制剤。
11. 細胞に、請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターの発現能を付与する工程、及び／又はP抗原を発現能を付与する工程を含んでなるヒトパルボウイルスB19吸着性又は感染感受性細胞の製造方法。
12. 細胞母集団から、請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを発現する細胞を単離する工程、及びP抗原を発現する細胞を単離する工程を含んでなるヒトパルボウイルスB19吸着性又は感染感受性細胞の製造方法。
13. 細胞母集団から、請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヒトパルボウイルスB19に対するレセプターが提示されている細胞を単離する工程を含むヒトパルボウイルスB19吸着性又は感染感受性細胞の製造方法。
14. 細胞母集団から、P抗原が提示されている細胞を単離する工程を含む請求項13記載の方法。

## ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

P抗原以外の新規なヒトパルボウイルスB19に対するレセプター並びに該ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターを利用した、ヒトパルボウイルスB19を測定用試薬、吸着用試薬及び感染抑制剤が開示されている。Ku80タンパクが、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターであることが見出された。従って、Ku80から成る、ヒトパルボウイルスB19に対するレセプターが提供された。ヒトパルボウイルスB19結合剤は、Ku80から成る。ヒトパルボウイルスB19の感染抑制剤は、Ku80とヒトパルボウイルスB19の結合を阻害する物質又はその結合性断片を有効成分として含有する。